

**Генетическое разнообразие бактерий,
адаптированных к цианидсодержащим соединениям
в техногенных экосистемах,
выявленное по последовательностям 16S рДНК**

М. П. БЕЛЫХ^{1,2}, С. В. ПЕТРОВ¹, А. Ю. ЧИКИН², Н. Л. БЕЛЬКОВА³

¹ Иркутский научно-исследовательский институт благородных
и редких металлов и алмазов
664025, Иркутск, Бульвар Гагарина, 38
E-mail: belykhmarina606@gmail.com

² Иркутский государственный университет
664011, Иркутск, ул. Нижняя Набережная, 6

³ Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3

Статья поступила 07.09.15

Принята к печати 04.02.16

АННОТАЦИЯ

Исследовано генетическое разнообразие природных микробных сообществ, развивающихся в системе рудный штабель – технологический раствор кучного выщелачивания. Установлено различие в структуре микробных сообществ: в рудном штабеле доминируют филотипы *Serratia* и *Achromobacter*, в технологическом растворе – *Hydrogenophaga*, *Acinetobacter* и *Exiguobacterium*. Анализ филогенетических взаимоотношений выявил среди ближайших гомологов микроорганизмы, способные к деградации токсичных соединений и/или проявляющие свою ферментативную активность при низких температурах. Показано, что для выделения микроорганизмов из автохтонных микробных сообществ природно-техногенных комплексов Восточной Сибири, исследования их деструктивных способностей и дальнейшего использования в биоремедиационных мероприятиях перспективными являются аэробные органогетеротрофы.

Ключевые слова: цианид, кучное выщелачивание, технологический раствор, рудный штабель, 16S рДНК, *Serratia*, *Achromobacter*, *Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Hydrogenophaga*.

Для решения экологических задач детоксикации отходов золотодобывающей промышленности особый интерес представляют методы биологического обезвреживания. В ми-

ровой практике для разработки новых экономически выгодных и экологически эффективных технологий биодеградациии цианидсодержащих соединений изолируют активные

штаммы микроорганизмов и используют их в биоремедиационных мероприятиях. На сегодняшний день исследован биотехнологический потенциал бактерий, принадлежащих к разным таксономическим группам: протеобактериям – *Achromobacter* sp., *Acinetobacter* sp. [Baxter, Cummings, 2006], *Methylobacterium thiocyanatum* [Wood et al., 1998], *Pseudomonas* spp. [Harris, Knowles, 1983; Григорьева и др., 2008], *Serratia marcescens* [Kumar et al., 2013]; фирмикутам – *Bacillus* spp. [Perumal et al., 2013; Mirizadeh et al., 2014]; актинобактериям – *Rhodococcus* spp. [Maniyam et al., 2011] и др. Большинство изолированных штаммов успешно применяются в технологии переработки цианидсодержащих отходов в регионах с теплым климатом [Harris, Knowles, 1983; Kumar et al., 2013; Mirizadeh et al., 2014]. Однако их использование для обезвреживания отходов золотодобывающих предприятий, расположенных на территории РФ, сталкивается с проблемой поддержания их активного состояния при резких суточных и сезонных колебаниях температур [Белых и др., 2014].

В условиях резко-континентального климата в автохтонных микробных сообществах природно-техногенных комплексов отходов кучного выщелачивания (КВ) развиваются микроорганизмы, адаптированные не только к высоким концентрациям определенных веществ, но и к условиям окружающей среды. Изучение их разнообразия позволяет адаптировать питательные среды и условия культивирования для получения штаммов, участвующих в деструкции токсичных соединений с учетом региональной специфичности и особенности химического состава горных пород. В настоящее время исследований, посвященных изучению разнообразия, состава и структуры таких микробных сообществ из отходов КВ золотодобывающих предприятий в Восточной Сибири, практически нет. Поэтому существует необходимость в идентификации микроорганизмов, развивающихся *in situ* в двух основных типах отходов КВ: технологическом растворе и рудном штабеле. Именно они выступают негативными факторами техногенного воздействия на воздух, почву, поверхностные и подземные воды и могут на длительное время определить состояние окру-

жающей среды в районе предприятия КВ. Проведение подобного рода исследований позволит предложить оптимальные условия для культивирования физиологически значимых групп бактерий, участвующих в детоксикации цианидов и их производных. Поэтому цель настоящего исследования – изучение генетического разнообразия природных микробных сообществ, развивающихся в системе рудный штабель – технологический раствор КВ, сравнение состава микроорганизмов и установление их филогенетических взаимоотношений с ближайшими гомологами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Отбор проб для исследования проводили в 2012 г. на одном из месторождений Красноярского края. Пробы технологического раствора и руды отбирали из действующего рудного штабеля КВ золота в стерильные емкости, транспортировали и хранили при температуре 4 °С до исследования.

Химический анализ технологического раствора проводили с использованием следующих методов: ионный состав кальция, магния и хлоридов измеряли титриметрическим методом (ПНД Ф 14.1:2.95–97, ПНД Ф 14.1:2.98–97, ПНД Ф 14.1:2.96–97 соответственно), сульфатов – турбидиметрическим (ПНД Ф 14.1:2.159–2000), цианидов и тиоцианатов – фотометрическим с пиридином и барбитуровой кислотой (ПНД Ф 14.1:2.56–96, ПНД Ф 14.1:2.4.156–99 соответственно), а общее солесодержание – гравиметрическим (ПНД Ф 14.1:2.4.114–97). Элементный состав металлов определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ПНД Ф 14.1:2.4.135–98). Дополнительно для определения химического состава твердой фазы руды использовали количественный рентгенофлуоресцентный анализ (по МА ИАЦ-53–2004 (ФР.1.31.2014.18483)).

Разнообразие микробных сообществ технологического раствора и рудного штабеля исследовали молекулярно-генетическим анализом фрагментов гена 16S рРНК [Белькова, Андреева, 2009]. Выделение ДНК осуществляли коммерческим набором AxyPrep Bacterial Genomic DNA “Axygen Biosciences” (США). Амплификацию вели на консерватив-

ных бактериальных праймерах (500L–1350R), ампликоны анализировали в агарозном геле, элюировали методом замораживания–оттаивания с последующим клонированием и секвенированием [Белькова, Андреева, 2009]. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI310A “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” (США) в ЦКП “Геномика” СО РАН (г. Новосибирск). Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с помощью программ FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>) и BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Филогенетические взаимоотношения с ближайшими гомологами оценивали с помощью пакета программ Mega v.6.06. Нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу данных и им присвоены номера: LK392396–LK392456.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Химический состав и содержание цианидсодержащих соединений в системе технологического раствора – рудный штабель. Учитывая, что исследуемые пробы отобраны из действующего рудного штабеля, химический состав технологического раствора соответствует составу межпоровой влаги руды. Характерными особенностями этих растворов являются высокие концентрации цианидов (2640 ПДК) и тиоцианатов (190 ПДК), а также значительное содержание тяжелых металлов: алюминия (53 ПДК), меди (50 ПДК), никеля (18 ПДК) и цинка (14 ПДК) (табл. 1).

Главными компонентами твердой фазы руды являются кремнезем (массовая доля 55,6 %) и глинозем (21,1 %), что обусловлено присутствием кварца и слюд. Доля общего железа не превышает 4,19 %, большая часть его находится в окисленной форме в виде гетита, и только 0,314 % – в сульфидной в виде пирита. Содержание щелочных и щелочноземельных металлов не превышает 5,5 % (K₂O – 3,8 %, Na₂O – 1,0 %, CaO – 0,042 %, MgO – 0,7 %) (табл. 2).

Тяжелые металлы поступают в межпоровую влагу руды в результате усиления процессов окисления при КВ золота, когда происходит их переход в подвижную форму в составе растворимых цианистых комплексов

Т а б л и ц а 1

Химический состав технологического раствора КВ (межпоровой влаги руды)

Определяемые компоненты	Концентрация, мг/л	ПДК (водные объекты рыбохозяйственного назначения), мг/л
рН	12,1	
	Общее солесодержание	
Кальций	375,0	180,0
Магний	Н.о.	40,0
Сульфаты	»	100,0
Хлориды	11,0	300,0
Цианиды	132,0	0,05
Тиоцианаты	19,0	0,1
Алюминий	2,12	0,04
Мышьяк	Н.о.	0,05
Висмут	»	0,1
Кадмий	»	0,005
Кобальт	0,01	0,01
Медь	0,05	0,001
Железо	Н.о.	0,1
Марганец	»	0,01
Никель	0,018	0,001
Свинец	Н.о.	0,1
Сурьма	»	0,05
Цинк	0,14	0,01

П р и м е ч а н и е. Н.о. – компонент не обнаружен.

[Некрасов, 1973]. Наличие в составе межпоровой влаги руды цианидов, концентрация которых существенно превышает значения ПДК (см. табл. 1), связано с применением для орошения рудного штабеля технологического раствора с их высоким содержанием.

Таким образом, принимая во внимание химический состав жидкой и твердой фазы отходов КВ золота, можно предполагать развитие в данных условиях специфических микробных сообществ, адаптированных к высокому содержанию цианидсодержащих соединений и тяжелых металлов.

Сравнительная характеристика структуры микробных сообществ рудного штабеля и технологического раствора. Молекулярное клонирование ампликонов 16S рДНК выявило невысокое разнообразие микробных сообществ, развивающихся в рудном штабеле и технологическом растворе. Сравнительный анализ показал различие по представленнос-

Химический состав твердой фазы рудного штабеля

Компонент	Массовая доля, %	Компонент	Массовая доля, %
SiO ₂	55,6	MnO	0,014
Al ₂ O ₃	21,1	P ₂ O ₅	0,033
TiO ₂	1,20	Sb	<0,001
MgO	0,7	Hg	<0,001
K ₂ O	3,8	Ni	0,005
Na ₂ O	1,0	WO ₃	0,004
CaO	0,042	Mo	<0,001
Fe _{общ}	4,19	Cu	0,0024
Fe _{ок}	3,99	Zn	0,004
Fe _s	0,314	Pb	0,0099
S _{общ}	0,035	C _{общ}	0,14
S _{ок.}	Н.о.	C _{орг}	<0,050
As _{общ}	0,105		
As _s	0,063		
As _{ок}	0,039		

П р и м е ч а н и е. Н.о. – компонент не обнаружен.

ти филоотипов – в руде идентифицированы микроорганизмы, относящиеся к актинобактериям и протеобактериям, в растворе дополнительно – фирмикуты. Следует отметить, что данных по изучению общего микробного разнообразия в отходах золотодобывающих предприятий КВ с помощью молекулярного клонирования или метагеномного анализа практически нет. Исследования с использованием таких методов активно проводятся для разного типа почвенных микробных сообществ [Петрова и др., 2010].

Сравнительный анализ полученных последовательностей с ближайшими гомологами из международных баз данных (Genbank и EMBL) выявил уровень сходства от 95,1 до 100 %, что позволило определить их родовую принадлежность [Пиневиц, 2006]. Нами идентифицированы представители родов: *Achromobacter* (гомология от 98,0 до 100 %), *Acinetobacter* (95,8–96,3 %), *Alcaligenes* (95,1 %), *Exiguobacterium* (95,8–96,2 %), *Hydrogenophaga* (95,3–97,5 %), *Pseudomonas* (99,5 %), *Propionibacterium* (99,3 %), *Rhodococcus* (98,7–99,2 %) и *Serratia* (99,5–100 %) (рис. 1).

Следует отметить, что в ранее проведенных исследованиях из загрязненных цианистыми соединениями руд и сточных вод золотодобывающих предприятий культивированы

и изучены штаммы: *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* spp. [Baxter, Cummings, 2006], *Pseudomonas* spp. [Harris, Knowles, 1983; Григорьева и др., 2008; и др.], *Rhodococcus* spp. [Maniyam et al., 2011] и *Serratia* sp. [Kumar et al., 2013]. Виды *Exiguobacterium* spp. и *Propionibacterium* spp. в отходах КВ золота не детектированы, однако они активно изолируются из загрязненных мест обитаний [Collins et al., 1983]. Кроме того, аналогич-

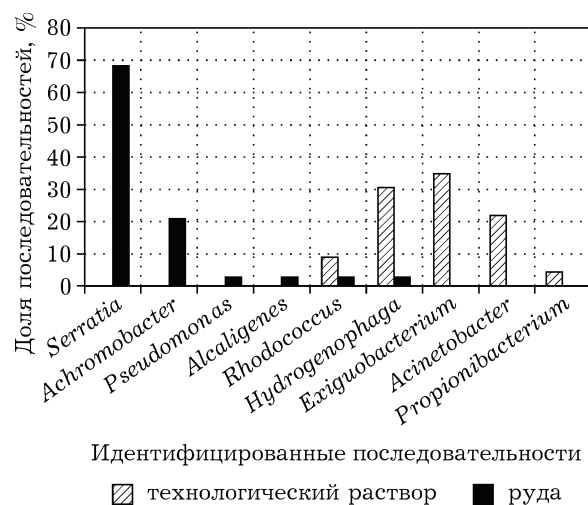


Рис. 1. Видовое разнообразие микробных сообществ, развивающихся в системе рудный штабель – технологический раствор

ными молекулярными методами в сходных техногенных экосистемах (хвостохранилищах, сточных водах [Zhang et al., 2010], активном иле и почве, загрязненной тяжелыми металлами [Brodie et al., 2006]) идентифицированы представители микроорганизмов, относящиеся ко всем выявленным нами родам.

Кроме того, нами показаны отличия в количественном соотношении филоотипов одного и того же рода в разных типах отходов. В рудном штабеле доминируют филоотипы протеобактерий – *Serratia* (68,4 %) и *Achromobacter* (21,1 %) (см. рис. 1). Их близкие гомологи выделены из загрязненных почв, устойчивы к тяжелым металлам и способны осуществлять деструкцию полициклических ароматических углеводородов [Ji et al., 2012]. Доля минорных форм в этом микробном сообществе составляет 10,5 % и представлена разными филоотипами протеобактерий и актинобактерий – *Alcaligenes*, *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas* и *Rhodococcus*. Важной особенностью их близких родственников является способность к деградации токсичных соединений, в том числе цианидов и тиоцианатов [Григорьева и др., 2008; Maniyam et al., 2011; Белых и др., 2014].

В микробиоценозе технологического раствора, кроме представителей протеобактерий – *Hydrogenophaga* (30,4 %), *Acinetobacter* (21,7 %), определены фирмикуты *Exiguobacterium* (34,8 %). Их гомологи преимущественно выделены из почв, загрязненных тяжелыми металлами, из активного ила очистных сооружений и сточных вод промышленной промышленности [Yoon et al., 2008]. Минорные формы (13,5 %) представлены только двумя видами актинобактерий – *Propionibacterium* и *Rhodococcus*, ближайшими родственниками которых выделены из техногенных экосистем и обладают способностью к деструкции полициклических ароматических углеводородов [Thomassin-Lacroix et al., 2001].

Таким образом, в микробных сообществах системы рудный штабель – технологический раствор выявлены представители типов: протеобактерии, актинобактерии и фирмикуты. Идентифицированные микроорганизмы адаптированы к высоким концентрациям цианидсодержащих соединений и тяжелых металлах, по типу питания относятся к органотеротрофам и являются аэробами. Показано,

что в процессе КВ при орошении цианидсодержащим раствором рудного штабеля происходит смена как доминирующих, так и минорных филоотипов микробных сообществ.

Сравнительная характеристика филогенетических взаимоотношений доминирующих филоотипов рудного штабеля с ближайшими гомологами. Учитывая различный уровень сходства (95,1–100 %) полученных последовательностей с ближайшими гомологами из международных баз данных (Genbank и EMBL), для сравнительной характеристики и идентификации проведен их филогенетический анализ с типовыми штаммами и ближайшими гомологами, изолированными или определенными в сходных по экологическим признакам экосистемах.

Представители рода *Serratia* являются доминирующими в микробном сообществе рудного штабеля. Полученные последовательности образуют кластер, вместе с видами *S. marcescens* subsp. *sakuensis* KRED^T и *S. nematodiphila* DZ0503SBS1^T (рис. 2). Вариабельность среди полученных последовательностей составляет от полной гомологии до пяти нуклеотидных замен.

Род *Serratia* принадлежит к семейству Enterobacteriaceae, класс гаммапротеобактерий. В настоящее время род содержит 20 видов, преимущественно изолированных из природных источников: почва, вода, растения. Типовой вид рода – *S. marcescens* DSM 30121^T – является оппортунистическим патогеном для человека. На филогенетическом древе последовательности, полученные из рудного штабеля, формируют отдельный кластер от типового вида рода *Serratia* и группируются вместе со штаммом *S. marcescens* subsp. *sakuensis* KRED^T, который изолирован из активного ила [Ajithkumar et al., 2003]. Учитывая, что в этот же кластер попадает вид *S. nematodiphila* DZ0503SBS1^T, отличающийся от *S. marcescens* subsp. *sakuensis* KRED^T тремя нуклеотидными заменами, корректно идентифицировать полученные последовательности только на уровне рода. Следует отметить, что в этот кластер входят последовательности представителей рода *Serratia*, полученные молекулярными методами из других, близких по экологии экосистем: почв, загрязненных тяжелыми металлами (HM461145, KF596616, KF511906), загрязненных речных

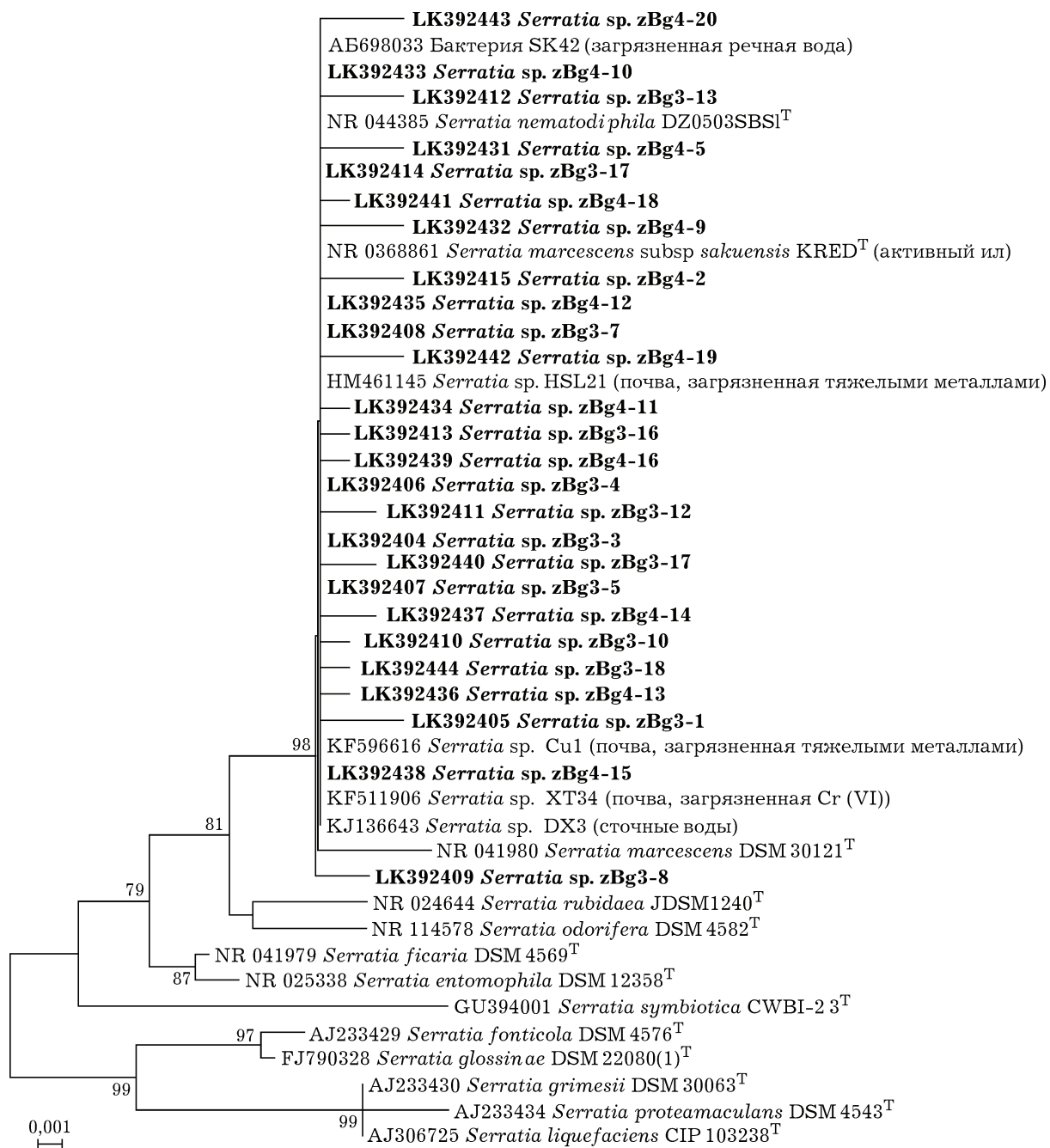


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рРНК для представителей рода *Serratia*.

Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует одной нуклеотидной замене на каждые 1000 п. н. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев; значения менее 75 % не указаны

(AB698033) и сточных вод (KJ136643) (см. рис. 2).

Последовательности, отнесенные к роду *Achromobacter*, образуют единый кластер с последовательностями типовых штаммов *A. insuavis* LMG 26845^T, *A. pulmonis* R-16442^T

и *A. xylosoxidans* DSM 10346^T (рис. 3). Вариативность среди полученных последовательностей составляет от 1 до 7 нуклеотидных замен.

Род *Achromobacter* является полифилетическим, принадлежит к сем. Alcaligenaceae, класс

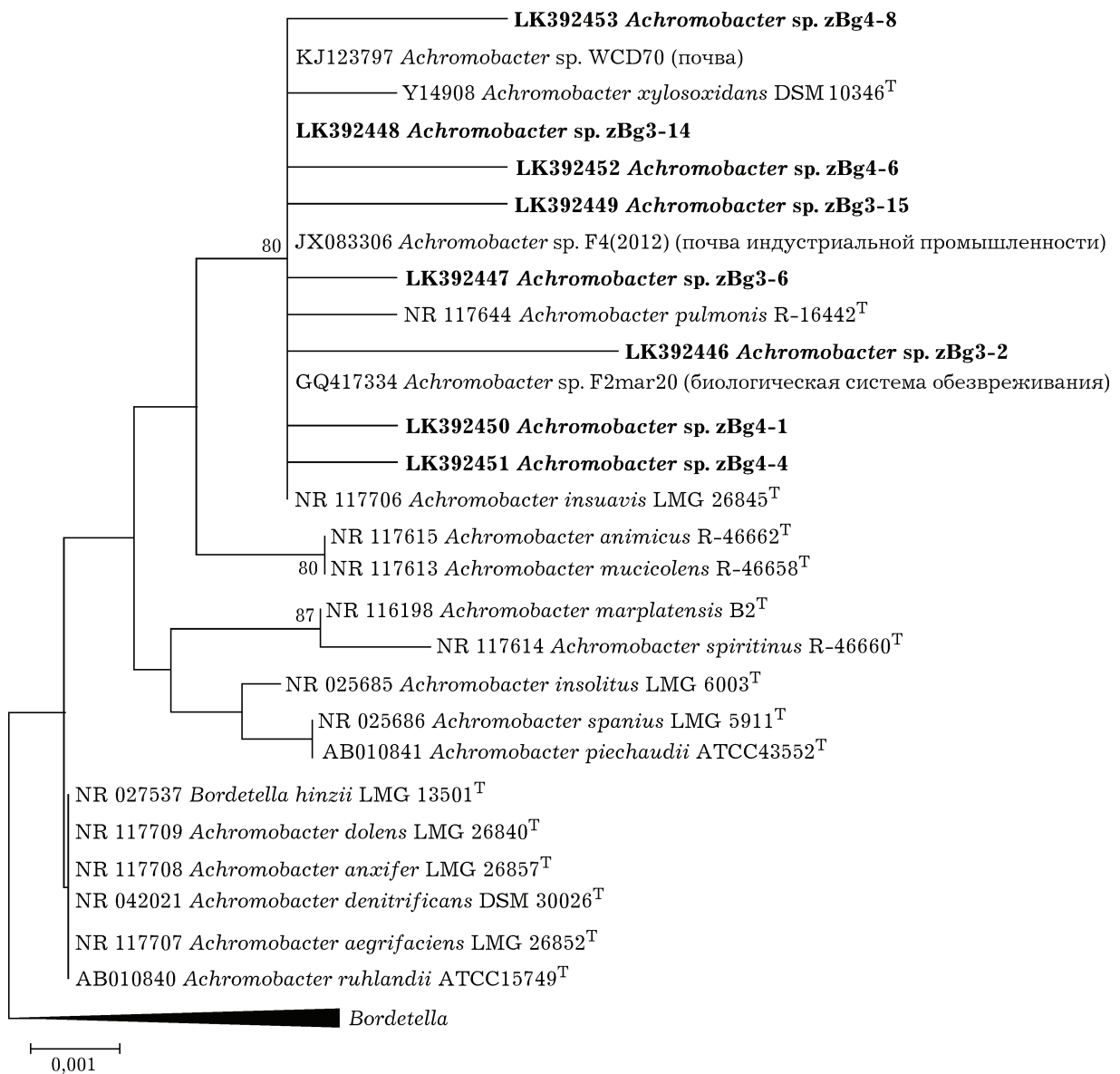


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рРНК для представителей родов *Achromobacter* и *Bordetella*.

Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует одной нуклеотидной замене на каждые 1000 п. н. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев; значения менее 75 % не указаны

бетапротеобактерий. До сих пор идет тщательная ревизия отдельных его представителей, особенно близких к родам *Alcaligenes* и *Bordetella* [Bergey's, 2005]. Среди ближайших гомологов полученных последовательностей отмечены представители рода *Bordetella*, однако анализ филогенетических взаимоотношений показал, что они группируются в разные кластеры (см. рис. 3). Род *Achromobacter* содержит 18 видов, изолированных

из различных источников: вода (*A. piechaudii*, *A. ruhlandii*) и почва (*A. marplatensis*). Типовой вид этого рода *A. xylosoxidans* DSM 10346^T является оппортунистическим патогеном для человека, однако он широко распространен в олиготрофных водных экосистемах [Bergey's, 2005]. Несмотря на то, что в последнее время активно изучаются штаммы, изолированные из клинических образцов [Vandamme et al., 2013], многие штам-

мы (NR116198, KJ123797, JX083306, GQ417334 и др.) выделены из природных и техногенных экосистем, но не все они идентифицированы до вида.

Анализ филогенетических взаимоотношений показал, что последовательности, полученные из рудного штабеля, группируются в один кластер с несколькими типовыми видами рода *Achromobacter* и могут быть идентифицированы на уровне рода как *Achromobacter* spp. Следует отметить, что кроме типовых в кластер попадают последовательности *Achromobacter* sp., полученные из биологических систем обезвреживания (GQ417334) и почв индустриальной промышленности (JX083306).

Таким образом, результаты филогенетического анализа подтверждают не только родовую принадлежность полученных последовательностей, но и их экологическую обособленность.

Сравнительная характеристика филогенетических взаимоотношений доминирующих фило типов технологического раствора с ближайшими гомологами. В микробиоценозе технологического раствора КВ определены последовательности представителей родов *Exiguobacterium* и *Acinetobacter*. Дополнительно и в растворе КВ, и в рудном штабеле детектированы *Hydrogenophaga*.

Представители рода *Exiguobacterium* выступают доминирующими в микробном сообществе технологического раствора КВ. Полученные последовательности входят в кластер с *E. indicum* NHS 31^T и *E. acetylicum* DSM 20416^T (рис. 4). Варибельность среди полученных последовательностей составляет от 22 до 48 нуклеотидных замен.

Род *Exiguobacterium* относится к классу бацилл, в настоящее время определен в самостоятельное семейство Family XII. Incertae Sedis [Bergey's, 2009]. Род содержит 15 видов, которые преимущественно выделены из природных источников – водоемов (*E. undae*, *E. aquaticum*), гидротермальных проявлений (*E. profundum*) или из загрязненных мест обитаний – сточных вод (*E. aurantiacum*, *E. oxidotolerans*, *E. alkaliophilum*) (см. рис. 4). Типовой вид рода – *E. aurantiacum* DSM 6208^T также изолирован из сточных вод и обладает способностью восстанавливать нитраты [Collins et al., 1983]. Некоторые представите-

ли данного рода являются термотолерантными и способны развиваться при низких температурах: *E. antarcticum* DSM 14480^T, выделен из микробного мата озера Фрикселл (Антарктика), *E. sibiricum* 255-15^T – из многолетней мерзлоты (Сибирь) [Bergey's, 2009].

Анализ филогенетических взаимоотношений показал, что последовательности, полученные из технологического раствора, формируют две самостоятельные ветви в кластере, отдельно от типового вида рода *Exiguobacterium* вместе с видами *E. indicum* NHS 31^T и *E. acetylicum* DSM 20416^T (см. рис. 4). Следует отметить, что штамм *E. indicum* NHS 31^T (NR042347) является психротрофным и изолирован из ледника Гималайского хребта (Индия), а *E. acetylicum* DSM 20416^T – выделен из сточных вод [Bergey's, 2009]. Кроме типовых в кластер входят последовательности, полученные молекулярными методами из близких по экологии экосистем: сточных вод (FJ013096), из природных и загрязненных почв (KJ456587, HQ380382, EF101987, JQ769719 и др.). Учитывая обособленность ветвей (см. рис. 4), полученные последовательности корректно идентифицировать только на уровне рода как *Exiguobacterium* spp.

На рис. 5 представлено филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рРНК для представителей рода *Acinetobacter*. Последовательности, идентифицированные в технологическом растворе, входят в кластер с представителями рода *Acinetobacter*, в том числе полученными молекулярными методами (см. рис. 5). Варибельность среди идентифицированных нами последовательностей составляет от 24 до 38 нуклеотидных замен.

Род *Acinetobacter* входит в сем. Moraxellaceae, класс гаммапротеобактерий, и содержит 35 видов. Несмотря на то, что типовой вид рода *Acinetobacter calcoaceticus* NCCB 22016^T выделен из клинического материала, многие виды рода *Acinetobacter* изолировались как из природных источников – почвы (*A. soli*), растений (*A. puyangensis*, *A. boissieri*, *A. nectaris*), так и из мест, подверженных антропогенному фактору активного ила (*A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii*, *A. junii* и *A. gernerii*) и сточных вод (*A. rudis*).

Анализ филогенетических взаимоотношений показал, что четыре последовательности (LK392424–LK392426, LK392428), иден-

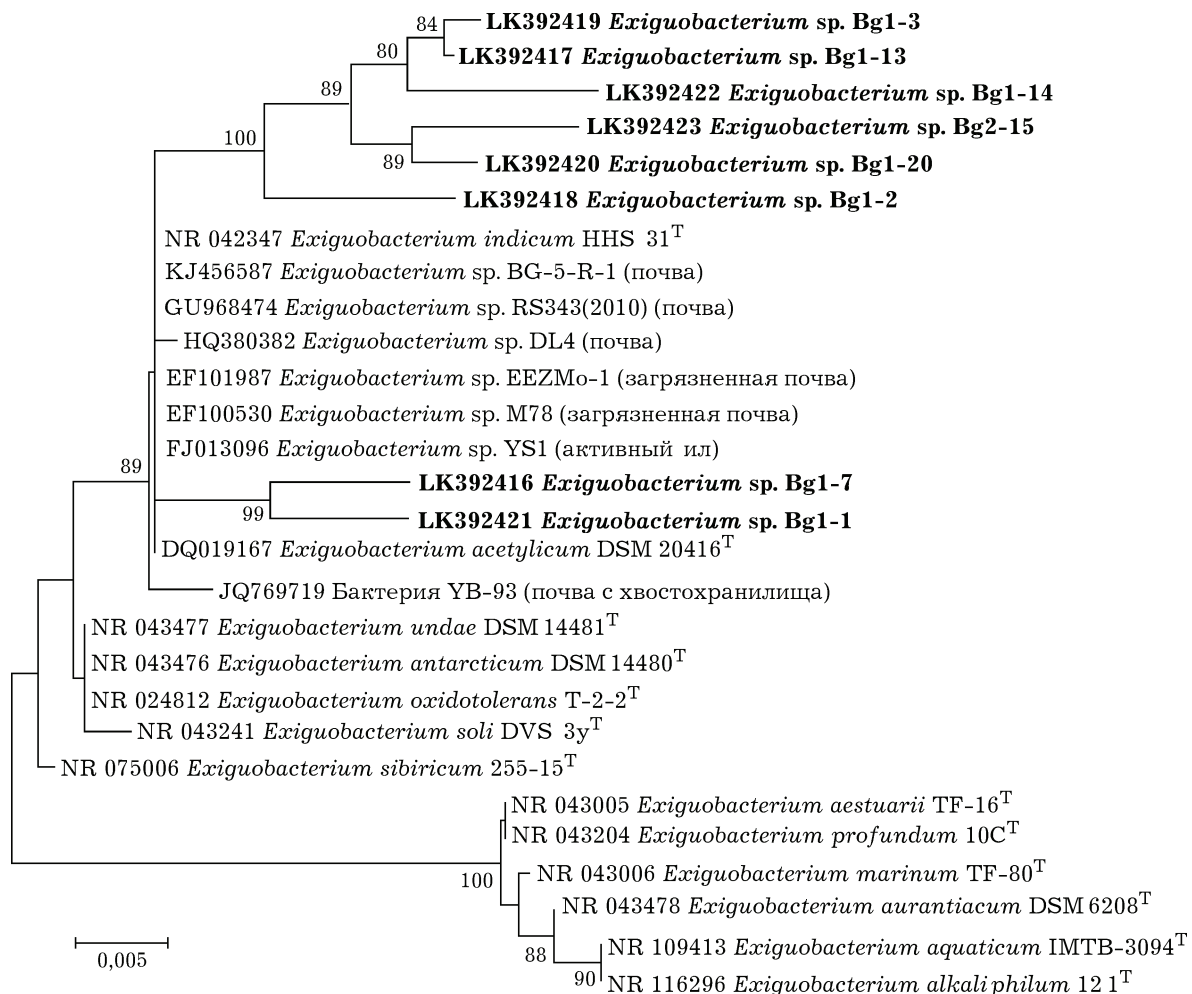


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рРНК для представителей рода *Exiguobacterium*.

Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует пяти нуклеотидным заменам на каждые 1000 п. н. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев; значения менее 75 % не указаны

тифицированные в технологическом растворе КВ, формируют отдельный кластер, филогенетически далеко расположенный от типовых штаммов рода *Acinetobacter*. Последовательность LK392427 образует кластер с типовым штаммом *A. radioresistens* DSM6976^T, который изолирован из почвы [Nishimura et al., 1988]. В этот же кластер входят последовательности, полученные молекулярными методами из близких по экологии экосистем – горных пород (JX849012), сточных вод (HM007538) и загрязненных почв (KF641666, DQ366086, HG316059, JX047439). Исходя из филогенетических позиций, полученные последовательности корректно идентифициро-

вать только на уровне рода как *Acinetobacter* spp.

Представители рода *Hydrogenophaga* определены как в технологическом растворе (LK392396–LK392400, LK392429–LK392430), так и в рудном штабеле (LK392454). Вариабельность среди полученных последовательностей составляет от 6 до 34 нуклеотидных замен. Среди ближайших гомологов с низким процентом гомологии (от 96,3 до 97,0 %) отмечены последовательности типовых штаммов двух родов филы протеобактерия: *Hydrogenophaga* и *Malikia*. Анализ филогенетических взаимоотношений подтвердил обособленность полученных последовательностей

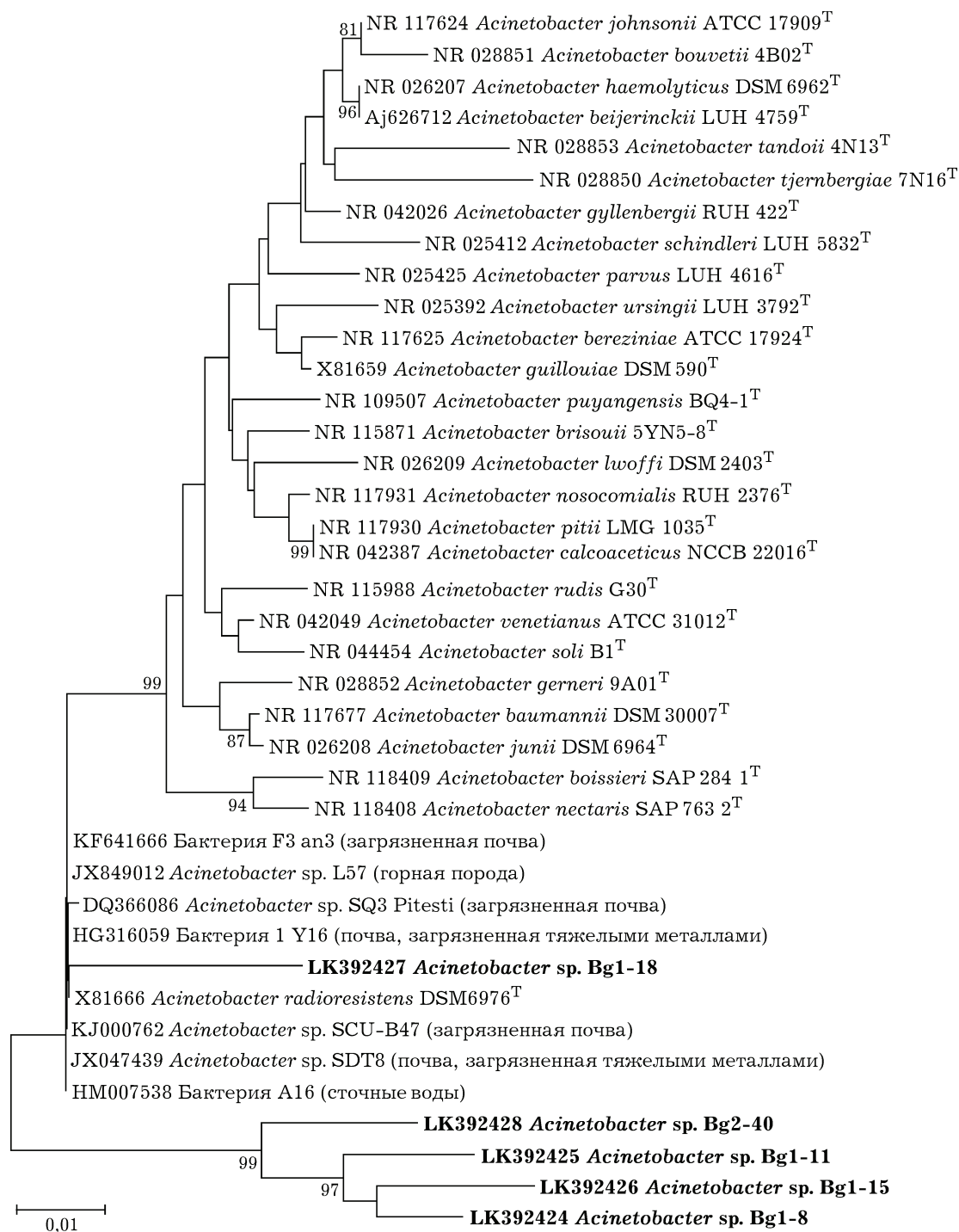


Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рРНК для представителей рода *Acinetobacter*.

Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Масштаб соответствует одной нуклеотидной замене на каждые 100 п. н. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев; значения менее 75 % не указаны

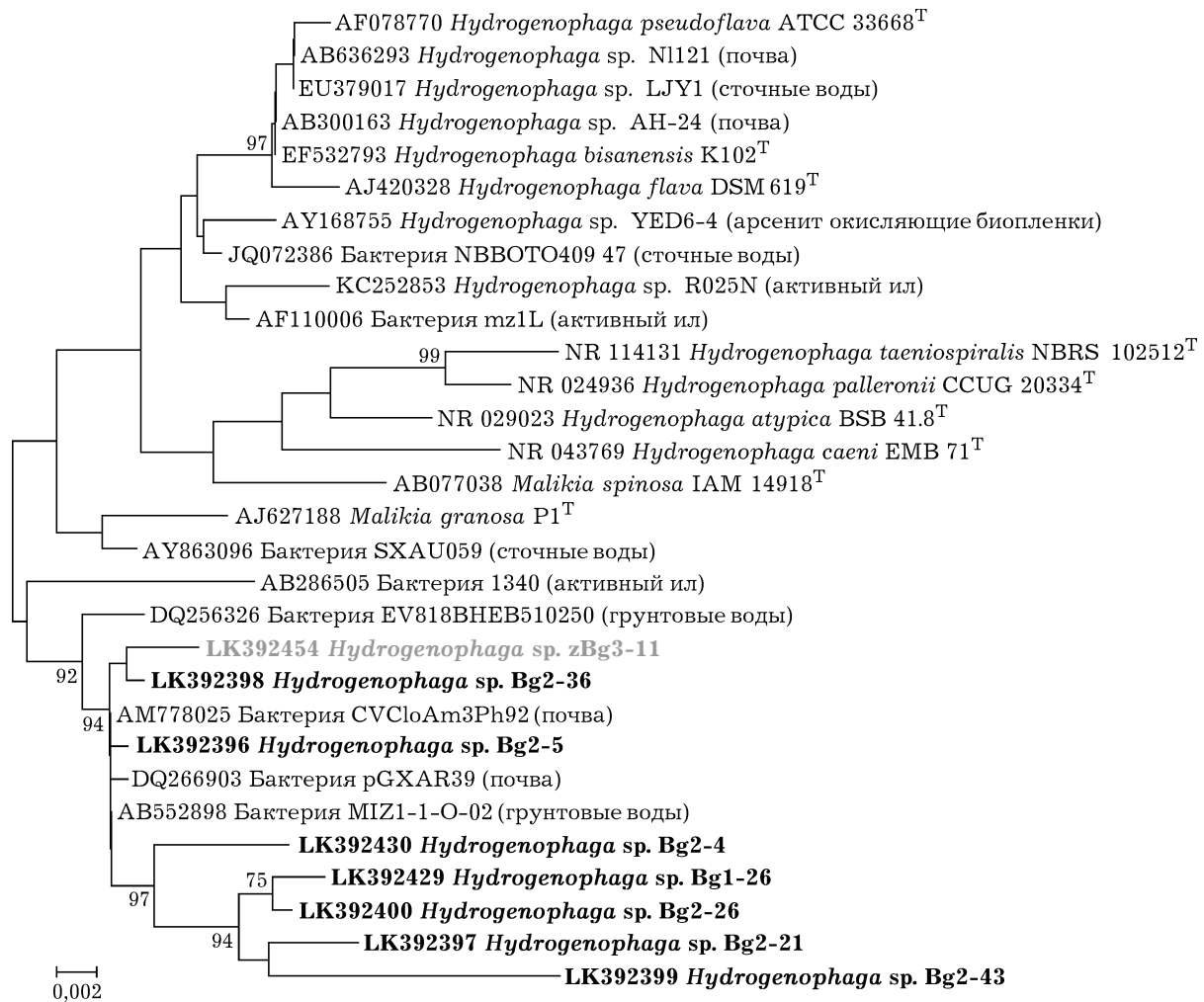


Рис. 6. Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рРНК для представителей рода *Hydrogenophaga*.

Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом: черным цветом – последовательности, выделенные из технологического раствора; серым цветом – из руды. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 1000 п. н. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью бутстреп-анализа 1000 альтернативных деревьев; значения менее 75 % не указаны

(рис. 6). Следует также отметить, что в этот кластер входят только последовательности микроорганизмов, таксономическое положение которых не определено, но изолированы они из почв (AM778025, DQ266903), грунтовых (DQ256326, AB552898) и сточных вод (AB286505).

Рода *Hydrogenophaga* и *Malikia* принадлежат к сем. Comamonadaceae, класс бетапротобактерии. В настоящее время род *Hydrogenophaga* содержит девять видов, которые преимущественно изолированы из природных источников (почвы, грязь, воды) и из мест, подверженных антропогенному воздействию

(*H. atypica*, *H. defluvii*, *H. bisanensis*, *H. caeni*). Входящие в род *Hydrogenophaga* четыре вида (*H. flava*, *H. pseudoflava*, *H. taeniospiralis* и *H. palleronii*), были реклассифицированы из рода *Pseudomonas* [Willems et al., 1989]. Род *Malikia* содержит всего два вида (*M. granosa* и *M. spinosa*), которые также реклассифицированы из рода *Pseudomonas* [Spring et al., 2005]. Учитывая сложности таксономической характеристики представителей обоих родов, полученные последовательности могут быть идентифицированы только на уровне семейства – как представители сем. Comamonadaceae.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно говорить о том, что в условиях системы рудный штабель – технологический раствор развиваются специфические микробные сообщества, адаптированные к высокому содержанию цианидсодержащих соединений и тяжелых металлов, разнообразие которых различается по представленности и количественному соотношению фило типов. В рудном штабеле доминируют фило типы *Serratia* spp. и *Achromobacter* spp. В микробиоценозе технологического раствора, кроме представителей *Hydrogenophaga* spp., *Acinetobacter* spp., доминируют представители рода *Exiguobacterium*.

Филогенетическим анализом определена не только родовая принадлежность идентифицированных последовательностей, но и их экологическая обособленность. Характеристики биохимических особенностей ближайших гомологов свидетельствуют о возможном наличии у микроорганизмов из отходов КВ аналогичных ферментов, катализирующих деструкцию токсичных соединений, и/или способности проявлять свою ферментативную активность при низких температурах. Охарактеризованные микроорганизмы, адаптированные к высоким концентрациям цианидсодержащих соединений и тяжелых металлов, являются аэробами и по типу питания относятся к органогетеротрофам, что следует в дальнейшем учесть при составлении питательных сред для их культивирования. Выделение и исследование деструктивных способностей микроорганизмов из автохтонных микробных сообществ природно-техногенных комплексов КВ золотодобывающих предприятий является перспективным направлением в биотехнологии обезвреживания отходов КВ.

ЛИТЕРАТУРА

- Белых М. П., Петров С. В., Чикин А. Ю., Стоянов И. Н., Белькова Н. Л. Автохтонные микробные сообщества из отходов кучного выщелачивания золотосодержащих руд: путь к решению проблемы загрязнения окружающей среды // Изв. ИГУ. Сер. Биология. Экология. 2014. Т. 9. С. 55–67.
- Белькова Н. Л., Андреева А. М. Введение в молекулярную экологию микроорганизмов: учеб.-метод. пособие. Ярославль: Принтхаус, 2009. 91 с.
- Григорьева Н. В., Смирнова Ю. В., Терехова С. В., Каравайко Г. И. Деструкция цианидов и тиоцианатов ассоциацией гетеротрофных бактерий и ее применение в биотехнологии // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. № 5. С. 554–558.
- Некрасов Б. В. Основы общей химии. М.: Химия, 1973. Т. 2. 656 с.
- Петрова С., Андронов Е., Пинаев А., Першина Е. Перспективы использования методов молекулярно-генетического анализа в почвенной экологии // Вестн. ОрелГАУ. 2010. Т. 26, № 5. С. 45–48.
- Пиневиц А. В. Микробиология. Биология прокариотов. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2006. Т. 1. 352 с.
- Ajithkumar B., Ajithkumar V. P., Iriye R., Doi Y., Sakai T. Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank // Int. Journ. Syst. Evol. Microbiol. 2003. Vol. 53. P. 253–258.
- Baxter J., Cummings S. P. The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination // Anton Leeuw Int. Journ. 2006. N 1. P. 1–17.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria / eds. D. J. Brenner, R. N. Krieg. USA: Springer Science and Business Media, 2005. Ed. 2. Vol. 2. 1388 p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes / eds. P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer, W. Whitman. USA: Springer, 2009. Ed. 2. Vol. 3. 1450 p.
- Brodie E. L., DeSantis T. Z., Joyner D. C., Baek S. M., Larsen J. T., Andersen G. L., Hazen T. C., Richardson P. M., Herman D. J., Tokunaga T. K., Wan J. M., Firestone M. K. Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72, N 9. P. 6288–6298.
- Collins M. D., Lund B. M., Farrow J. A. E., Schleif K. H. Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. // J. Gen. Microbiol. 1983. Vol. 129. P. 2037–2042.
- Harris R., Knowles C. J. Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilizes cyanide as a source of nitrogen // Ibid. 1983. Vol. 129. P. 1005–1011.
- Ji L. Y., Zhang W. W., Yu D., Cao Y. R., Xu H. Effect of heavy metal-solubilizing microorganisms on zinc and cadmium extractions from heavy metal contaminated soil with *Tricholoma lobynsis* // World Journ. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 28, N 1. P. 293–301.
- Yoon J. H., Kang S. J., Ryu S. H., Jeon Ch. O., Oh T. K. *Hydrogenophaga bisanensis* sp. nov., isolated from wastewater of a textile dye works // Int. Journ. Syst. Evol. Microbiol. 2008. Vol. 58. P. 393–397.
- Kumar V., Kumar V., Bhalla T.C. In vitro cyanide degradation by *Serratia marcescens* RL2b // Int. Journ. Environ. Sci. 2013. Vol. 3, N 6. С. 1969–1979.
- Maniyam M. N., Sjahrir F., Ibrahim A.L. Bioremediation of cyanide by optimized resting cells of *Rhodococcus* strains isolated from Peninsular Malaysia // Int. Journ. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011. Vol. 1, N 2. P. 98–101.
- Mirzadeh S., Yaghmaei S., Ghobadi Nejad Z. Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under

- alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM) // *J. Environ. Health. Sci. Eng.* 2014. Vol. 12, N 85. P. 1–9.
- Nishimura Y., Ino T., Iizuka H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil // *Int. Journ. Syst. Bacteriol.* 1988. Vol. 38. P. 209–211.
- Perumal M., Prabakaran J. J., Kamaraj M. Isolation and characterization of potential cyanide degrading *Bacillus nealsonii* from different industrial effluents // *Int. Journ. Chem. Tech. Res.* 2013. Vol. 5, N 5. P. 2357–2364.
- Spring S., Wagner M., Schumann P., Kämpfer P. *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphateaccumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. // *Int. Journ. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. Vol. 55. P. 621–629.
- Thomassin-Lacroix E. J., Yu Z., Eriksson M., Reimer K. J., Mohn W. W. DNA-based and culture-based characterization of a hydrocarbon-degrading consortium enriched from Arctic soil // *Can. Journ. Microbiol.* 2001. Vol. 47, N 12. P. 1107–1115.
- Vandamme P., Moore E. R. B., Cnockaert M., Peeters Ch., Svensson-Stadler L., Houf K., Spilker T., LiPuma J. J. Classification of *Achromobacter* genogroups 2, 5, 7 and 14 as *Achromobacter insuavis* sp. nov., *Achromobacter aegrifaciens* sp. nov., *Achromobacter anxifer* sp. nov. and *Achromobacter dolens* sp. nov., respectively // *Syst. Appl. Microbiol.* 2013. Vol. 36, N 7. P. 474–482.
- Willems A., Busse J., Goor M., Pot B., Falsen E., Jantzen E., Hoste B., Gillis M., Kersters K., Auling G., Ley J. D. *Hydrogenophaga*, a new genus of hydrogen-oxidizing bacteria that includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (formerly *Pseudomonas pseudoflava* and “*Pseudomonas carboxydoflava*”), and *Hydrogenophaga taeniospiralis* (formerly *Pseudomonas taeniospiralis*) // *Int. Journ. Syst. Evol. Microbiol.* 1989. Vol. 39, N 3. P. 319–333.
- Wood A. P., Kelly D. P., McDonald I. R., Jordan S. L., Morgan T. D., Khan S., Murrell J. C., Borodina E. A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources // *Arch. Microbiol.* 1998. Vol. 169, N 2. P. 148–158.
- Zhang C., Jia L., Wang S., Qu J., Li K., Xu L., Shi Y., Yan Y. Biodegradation of beta-cypermethrin by two *Serratia* spp. with different cell surface hydrophobicity // *Bioresour. Technol.* 2010. Vol. 101, N 10. P. 3423–3429.

Genetic Diversity of Bacteria Adapted to Cyanide-Bearing Compounds in the Technogenic Ecosystems as Detected by 16S rDNA Sequences

M. P. BELYKH^{1,2}, S. V. PETROV¹, A. Ju. CHIKIN², N. L. BELKOVA³

¹ *Irkutsk Research Institute of Precious and Rare Metals and Diamonds JSC*
664025, Irkutsk, Gagarina blvd., 38
E-mail: belykhmarina606@gmail.com

² *Irkutsk State University, Pedagogical Institute,*
664011, Irkutsk, Lower Quay str., 6

³ *Limnological Institute SB RAS*
664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya str.. 3

The genetic diversity of microbial communities developed naturally within the system of ore heap-solution of heap leaching process was studied. The difference of the microbial community structure was identified. It was found that phylotypes *Serratia* and *Achromobacter* dominated within the ore heap and *Hydrogenophaga* and *Acinetobacter* dominated in the solution. Phylogenetic analyses revealed that there were microorganisms among the closest homologues which were able to destruct toxic compounds and/or exhibit their enzyme activity at low temperature. It was shown that aerobic organoheterotrophs were the most promising for isolation from autochthonous microbial communities of technogenic complexes in East Siberia, study of their destructive potential and use of them for bioremediation.

Key words: cyanide, heap leaching, process solution, ore heap, 16S rDNA, *Serratia*, *Achromobacter*, *Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Hydrogenophaga*.